

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-277091

(43)公開日 平成6年(1994)10月4日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 P 21/06		8214-4B		
A 6 1 K 37/18	A E Q	8314-4C		
37/64	A B U	8314-4C		
C 0 7 K 1/12		8318-4H		
5/08		8318-4H		
審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全4頁)				

(21)出願番号 特願平5-92553
(22)出願日 平成5年(1993)3月26日

(71)出願人 000004101
日本合成化学工業株式会社
大阪府大阪市北区野崎町9番6号
(72)発明者 吉川正明
京都府城陽市市辺北垣内8-1
(72)発明者 藤田裕之
大阪府吹田市千里山星ヶ丘9-203
(72)発明者 長谷川昌康
京都府京都市伏見区深草坊町35

(54)【発明の名称】 新規ペプチド、それを製造する方法及び用途

(57)【要約】

【目的】 本発明は、アンギオテンシン変換酵素阻害作用をもち血圧降下剤として有用な、新規ペプチド及びその製造法に関する。

【構成】 $H-Val-Arg-Tyr-OH$ で示される新規ペプチドであり、該ペプチドはカゼインを加水分解することによって製造される。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 H-Val-Arg-Tyr-OH よりなる新規ペプチド。

【請求項2】 蛋白質をサーモライシンで加水分解することを特徴とする H-Val-Arg-Tyr-OH よりなる新規ペプチドを製造する方法。

【請求項3】 蛋白質としてカゼインを使用する請求項2記載の製造法。

【請求項4】 H-Val-Arg-Tyr-OH よりなるペプチドを有効成分とするアンギオテンシン変換酵素阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、下記構造を有する新規なペプチドを提供するものであり、アンギオテンシン変換酵素阻害剤等として有用なペプチドに関する。 H-Val-Arg-Tyr-OH

【0002】

【従来の技術】アンギオテンシン変換酵素は、主として肺や血管内皮細胞、腎近位尿細管に存在し、アンギオテンシンI ($\text{Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu}$) に作用して、アンギオテンシンIのC末端よりジペプチド ($\text{His}^9\text{-Leu}^{10}$) を開裂遊離させ、強力な昇圧作用を有するアンギオテンシンIIを生成させる酵素である。また、この酵素は生体内降圧物質であるブラジキニンを破壊し不活化する作用も併有し、昇圧系に強力に関与している。従来より、アンギオテンシン変換酵素の活性を阻害すれば、降圧に働き、臨床的には高血圧症の予防、治療に有効であると考えられている。最近ではプロリン誘導体であるカプトプリルが合成され、降圧活性が確認されて以来、種々のアンギオテンシン変換酵素阻害物質の合成研究が盛んであり、又天然物からの取得も試みられているところである。天然物由来のアンギオテンシン変換酵素阻害剤は食品あるいは食品原料から得られるので低毒性で安全性の高い降圧剤となることが期待されるからである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、天然物中に見出されるアンギオテンシン変換酵素阻害物質は極めてまれで、僅かにブラジル産や日本産蛇毒より得られたテプロタイド (ノナペプチド, SQ20881) 等や、ストレプトミセス属に属する放線菌の代謝産物 IS83 (特開昭58-177920号公報) が知られているに過ぎない。また、天然物を酵素処理して得られたアンギオテンシン変換酵素阻害物質としては、牛乳カゼインをトリプシンにより分解して得たペプチド類等が知られているが (特開昭58-109425号、同59-44323号、同59-44324号、同61-36226号、同61-36227号) 新規な阻害物質の開発が

望まれているところである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる課題を解決すべく天然物質で副作用の少ないアンギオテンシン変換酵素阻害物質を鋭意探索した結果、蛋白質特にカゼインを特定の酵素で加水分解した組成物中にアンギオテンシン変換酵素阻害活性を有する物質の存在をつきとめ、該物質が H-Val-Arg-Tyr-OH よりなるペプチドであることを知見し、本発明を完成した。

【0005】本発明の H-Val-Arg-Tyr-OH よりなるペプチドは文献未載の新規なペプチドであり、カゼイン等の蛋白質をサーモライシンによって加水分解することによって製造され、実用にあたっては組成物をそのまま用いても良く、あるいは必要に応じて精製して使用される。更にはペプチド合成の常套手段を適用して合成することによって製造することもできる。上記でいうValはバリン、Argはアルギニン、Tyrはチロシンを意味し、かかるアミノ酸はいずれもL-体である。

【0006】本発明のペプチドは蛋白質をサーモライシンで加水分解することによっても、ペプチド合成法でも取得できる。蛋白質をサーモライシンで加水分解するには、蛋白質の性状により処法は異なるが、難溶性の場合には熱水に蛋白質を混合し強力な攪拌でホモジナイズし、所定量のサーモライシンを加え温度 $10\sim 85^\circ\text{C}$ 程度で0.1~48時間反応を行う。蛋白質としては、動物由来や微生物由来のもの等が任意に用いられ、特に有用なものはカゼインである。加水分解液中には本発明のペプチド以外に、他のペプチドが存在しているが、これらは混合物のままでも各種の用途に用いられても良く、又、本発明のペプチドのみを単離して用いても差し支えない。単離する場合は加水分解液を遠心分離等の公知の操作で濾過する。その後抽出、濃縮、乾固などを適用した後、あるいはせずしてそのまま、種々の吸着剤に対する吸着親和性の差、種々の溶剤に対する溶解性あるいは溶解度の差、2種の混ざり合わない液相間における分配の差、分子の大きさに基づく溶出速度の差、溶液からの析出性あるいは析出速度の差などを利用する手段を適用して目的物を単離するのが好ましい。これらの方法は必要に応じて単独に用いられ、あるいは任意の順序に組合せ、また反覆して適用される。

【0007】本発明のペプチドはペプチド合成に通常用いられる方法、即ち液相法または固相法でペプチド結合の任意の位置で二分される2種のフラグメントの一方に相当する反応性カルボキシル基を有する原料と、他方のフラグメントに相当する反応性アミノ基を有する原料とをカルボジイミド法、活性エステル法等を用いて縮合させ、生成する縮合物が保護基を有する場合、その保護基を除去させることによって製造し得る。

【0008】この反応工程において反応に関与すべきで

(3)

3

ない官能基は、保護基により保護される。アミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシカルボニル、*t*-ブチルオキシカルボニル、*p*-ビフェニルイソプロピロオキシカルボニル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル等が挙げられる。カルボキシ基の保護基としては例えばアルキルエステル、ベンジルエステル等を形成し得る基が挙げられるが、固相法の場合は、C末端のカルボキシ基はクロルメチル樹脂、オキシメチル樹脂、*P*-アルコキシベンジルアルコール樹脂等の担体に結合している。縮合反応は、カルボジイミド等の縮合剤の存在下にあるいはN-保護アミノ酸活性エステルまたはペプチド活性エステルを用いて実施する。

【0009】縮合反応終了後、保護基は除去されるが、固相法の場合はさらにペプチドのC末端と樹脂との結合を切断する。更に、本発明のペプチドは通常の方法に従い精製される。例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。本発明で使用するペプチドの投与経路としては、経口投与、非経口投与、直腸内投与のいずれでもよいが、経口投与が好ましい。本発明のペプチドの投与量は、化合物の種類、投与方法、患者の症状・年齢等により異なるが、通常1回0.001~1000mg、好ましくは0.01~10mgを1日当たり1~3回である。本発明のペプチドは通常、製剤用担体と混合して調製した製剤の形で投与される。

【0010】製剤用担体としては、製剤分野において常用され、かつ本発明のペプチドと反応しない物質が用いられる。具体的には、例えば乳糖、ブドウ糖、マンニト、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロゼラチン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン界面活性剤、プロピレングリコール、水等が挙げられる。

【0011】剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。尚、液体製剤にあっては、用時、水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方

4

法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のペプチドを水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。これらの製剤は、本発明のペプチドを0.01%以上、好ましくは0.5~70%の割合で含有することができる。これらの製剤はまた、治療上価値ある他の成分を含有していてもよい。

【0012】

【作用】本発明のペプチドは、新規なペプチドであり優れたアンギオテンシン変換酵素阻害作用を有し、血圧降下作用、ブラジキニン不活化抑制作用を示し本態性高血圧、腎性高血圧、副腎性高血圧などの高血圧症の予防、治療剤、これらの疾患の診断剤や各種の病態において用いられる血圧降下剤、狭心発作の閾値上昇、心筋梗塞の減少、うっ血性心不全における病態の改善剤として有用である。

【0013】

【実施例】次に実例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

【ペプチドの製造】

(A) カゼイン5gに水40mlを加え充分ホモジナイズし、サーモライシンを20mg加え37℃、pH7で3時間加水分解反応を行った。100℃で10分間煮沸し、冷却後遠心分離して濃縮し、高速液体クロマトグラフィー(ODS-, Ph-及びCN-カラム)により精製し、ペプチドを得た。本品を気相プロテインシーケンサー(アブライド バイオシステムズ社製 477 A型)を用いる自動エドマン分解法を適用してアミノ酸配列を分析し、下記の構造を得た。

H-Val-Arg-Tyr-OH

【0014】該ペプチドの物性値はつぎのとうりである。

TLC [n-ブタノール：酢酸：ピリジン：水=15：3：10：12]

(シリカゲルプレート、ニンヒドリン発色)

Rf: 0.19

元素分析 C₂₀H₃₂N₆O₅・0.9H₂Oとして

	C	H	N
計算値	53.06	7.53	18.56
測定値	53.04	7.06	18.50

【0015】【ペプチドの合成】市販のBoc(ブトキシカルボニル)-Tyr(Cl₂-Bzl)(ジクロルベンジル基)-O-Resin(置換率0.75meq/g)0.4gをバイオサーチ社のペプチド合成装置SAM2の反応槽に分取し、以下のように合成を行った。45%トリフルオロ酢酸、2.5%アニソールを含む塩化メチレン中、25分間の反応により、Boc基を除去したのち、塩化メチレンによる洗浄、10%ジイソプロピルエチルアミンを含む塩化メチレンによる中和、及び

(4)

5

塩化メチレンによる洗浄を行った。これと5mlの0.4M Boc-Arg (Tos) (トシル基) のジメチルホルムアミド溶液、5mlの0.4Mジイソプロピルカルボジイミドの塩化メチレン溶液とを混合した後、反応槽に加え、室温にて2時間攪拌反応させた。

【0016】得られた樹脂をジメチルホルムアミド、塩化メチレン、10%ジイソプロピルエチルアミンを含む塩化メチレン、塩化メチレン更に塩化メチレン及びジメチルホルムアミドとの混合液で洗浄し、Boc-Arg (Tos) - Tyr (Cl₂-Bzl) - 樹脂を得た。引き続き同様のBoc基の除去、Bocとアミノ酸のカップリングを繰り返しVal-Arg (Tos) - Tyr (Cl₂-Bzl) - 樹脂を得た。該樹脂を20mlの10%アニソールを含むフッ化水素中で0℃、1時間攪拌し、ペプチドを樹脂から遊離させた。フッ化水素を減圧留去し、残渣を30%酢酸で抽出し、凍結乾燥して粗ペプチドを得た。これをODSカラム (Cosmosil 5C₁₈) による逆相クロマトグラフィーにより精製し、H-Val-Arg-Tyr-OH (収量65.5mg) を得た。本品を前記と同一のプロテインシーケンサーにより分析した結果、上記の組成であることが判明した。

【0017】該ペプチドの物性値はつぎの通りである。尚、TLCの溶媒は以下すべて前記と同一である。

Rf: 0.19

元素分析 C₂₀H₃₂N₆O₆ · 0.3H₂Oとして

	C	H	N
計算値	54.36	7.44	19.02
測定値	54.45	7.41	19.01

【0018】 (アンギオテンシン変換酵素阻害活性の測 30

6

定) アンギオテンシン変換酵素阻害活性の測定は、CheungとCushmanの方法 [Biochemical Pharmacology 20, 1637 (1971)] に準じて以下の方法で行った。

酵素基質; Bz (ベンジル) - Gly-His-Leu (86mgを水8mlとリン酸緩衝液8mlに溶解した溶液)

酵素; うさぎの肺のアセトンパウダー (シグマ社製) (1gを50mMのリン酸緩衝液10ml中で粉碎した後、遠心分離した上澄液)

上記の酵素基質を100μl、酵素溶液を12μl及び本発明の所定濃度のペプチドを混合し、水で全体を250μlとした後、37℃で30分間反応を行った。

【0019】反応は1N-HCl 250μlを用いて終了させた。反応終了液に酢酸エチル1.5mlを入れVortexで15秒攪拌し、それを遠心分離した。酢酸エチル層から1.0mlをとり出して、酢酸エチルを留去し、それに1mlの蒸留水を入れて残渣を溶解し、抽出された馬尿酸の紫外吸収228nmの値 (OD₂₂₈) を測定した。阻害率は阻害剤なしで反応したときのOD₂₂₈を100%とし、反応時間0分のときのOD₂₂₈を0%として求め阻害率50%の時の阻害剤 (本発明のペプチド) の濃度IC₅₀ (μM) で活性を表示すると80.0であった。

【0020】

【発明の効果】本発明ではアンギオテンシン変換酵素阻害剤として有用な、新規なペプチドが得られる。